

**Anwendung des Reihenverdünnungstestes
als Mikromethode zur Bestimmung von
Ampicillinblutspiegeln bei Kindern**

Manfred Behrends

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0072

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

Anwendung des Reihenverdünnungstestes als Mikrome-
thode zur Bestimmung von Ampicillinblutspiegeln bei
Kindern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manfred Behrends

aus

Jever

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J.-D. Murken
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1975

Inhaltsübersicht

Anwendung des Reihenverdünnungstestes als Mikromethode
zur Bestimmung von Ampicillinblutspiegeln bei Kindern

I. Einleitung

II. Standardmethoden zur Ermittlung von Antibiotikum- spiegeln

1. Plattendiffusionsteste
2. Reihenverdünnungsteste

III. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials
2. Auswahl der verwendeten Geräte und Materialien
 - 2.1. Nährlösung
 - 2.2. Herstellung der Keimsuspension
 - 2.3. Mikroplatten
 - 2.4. Titriergeräte
 - 2.5. Vorlegen von Nährlösungen oder anderer
Flüssigkeiten
 - 2.6. Auswahl des Testkeimes
3. Herstellung von Ampicillinverdünnungen
4. Kontrollplattenherstellung für die Reihenver-
dünnung

5. Reproduzierbarkeit
6. Wuchsbild der Kontrollplatte
7. MIC - Ermittlung
8. Voruntersuchung zur Pivampicillinresorption
 - 8.1. Probenentnahme
 - 8.2. Anwendung der Methode bei Erwachsenenserum
9. Verdünnungsschemata für die Kinderseren
10. Ergebnisse bei Kindern
 - 10.1. Ergebnisse bei anderen Probandengruppen

IV. Diskussion

1. Zur Schwankungsbreite der einzelnen Serumspiegel
2. Vor- und Nachteile von Diffusionstesten, dem Reihenverdünnungstest und dem Plattenverdünnungstest
3. Anmerkungen zu dem verwendeten Gerät und Material
4. Die Ampicillinverdünnungen
5. Kontrollplattenherstellung
6. Prüfung der eigenen Ergebnisse

V. Zusammenfassung

I. Einleitung

Als die modernen Antibiotika noch nicht bekannt waren, hat man nicht selten bei der Wundbehandlung mehr oder weniger intuitiv auf "Hausmittel" zurückgegriffen, die, auch nach den heutigen Erkenntnissen durchaus antibakteriell wirksam gewesen sein können.

So findet sich beispielsweise in dem 1640 in London erschienenen Opus "Theatrum Botanicum" des Apothekers John Parkinson der Hinweis auf eine prophylaktisch wirksame Wund-Spezialsalbe. Hauptbestandteil dieser Salbe: der moosartige, (aus Schimmelpilzen bestehende) Belag alter Totenschädel. - Auch Urin und Dung wurde angewandt. (19)

Der klinische Erfolg ist ausschlaggebend.

Angeichts einer Unzahl chemisch relativ nah miteinander verwandter Antibiotika, die bereits auf dem Markt sind, kann die vergleichende Prüfung und Bewertung neuer Antibiotika nur nach naturwissenschaftlich exakten Kriterien erfolgen. Dazu gehört neben der Resistenzprüfung die Ermittlung der Wirkspiegel, welche die verschiedenen Antibiotika nach Applikation in Blut und Geweben der Probanden erreichen. Wichtig ist dabei auch noch, daß zum Teil abhängig von der Applikationsform und galenischen Zubereitung chemisch gleicher Präparate ob oral oder parenteral verabreicht, unterschiedliche Spiegel erzielt werden. So ist es zum Beispiel beim Antibiotikum Ampicillin. Bei

Gaben äquimolar gleicher Ampicillindosen werden parenteral höhere Spiegel erzielt als oral. (2, 7, 13, 20)

Da heute zunehmend Wert auf Erreger-Nachweis und Resistenztestung bei den verschiedenen Antibiotika gelegt wird, um eine Korrelation zwischen Sensibilitätsgrad und klinischem Erfolg herleiten zu können (8), ist besonders bei Neueinführung eines Antibiotikums eine geeignete Methode zur Ermittlung der Wirkspiegel erwünscht.

Am Beispiel eines neuen Ampicillinderivates Pivampicillin wird in dieser Arbeit die Anwendung einer Mikromethode des am längsten bekannten Reihenverdünnungstestes beschrieben, da vorwiegend Kinder untersucht wurden. (5, 6, 7, 14, 17, 21, 22)

Die Vor- und Nachteile gegenüber Plattendiffusionstesten werden diskutiert.

Beim Pivampicillin handelt es sich um eine Ampicillin-esterverbindung, die nach oraler Applikation quantitativ fast vollständig resorbiert wird und sofort in freies Ampicillin hydrolisiert. (2, 7, 13, 20)

Man kann deshalb mit Ampicillin-Natrium die Empfindlichkeit der Bakterien auf Pivampicillin bestimmen.

Bei Anwendung des Reihenverdünnungstestes als Mikromethode ist der große Materialaufwand, zum einen an Laborgerät und Material, zum anderen aber auch gerade in bezug auf die benötigten Mengen der zu untersuchenden Flüssigkeitsproben von Nachteil.

Bei Blutuntersuchungen setzt das Blutmengen voraus, die mindestens im Größenbereich von ganzzahligen ml-Mengen liegen. Das würde in jedem Fall eine intravenöse Blutabnahme bedeuten.

Will man den zeitlichen Verlauf der Wirkspiegel im Blut nach Gabe von Antibiotika feststellen - dies setzt mehrere Abnahmen voraus - dann wäre es wünschenswert, mit μ l-Mengen Blut auszukommen, die durch Stiletierung der Fingerbeere gewonnen werden können. Speziell bei Kindern und Säuglingen ist das von Bedeutung, denn gerade da ist es in der Klinik manchmal entscheidend, die Serumspiegel toxischer Antibiotika zu untersuchen, um eine Unter- oder Überdosierung zu vermeiden.

Bei Säuglingen können die Blutmengen durch Stiletierung der Ferse gewonnen werden.

II. Standardmethoden zur Ermittlung von Antibiotikumspiegeln

1. Plattendiffusionsteste

Als gebräuchliche Methoden, sogenannte Standardmethoden, werden in Labors neben Reihenverdünnungstesten im Röhrchen und in Agar vorwiegend Plattendiffusionsteste benutzt, um Antibiotikumswirkspiegel zu ermitteln. (5, 6, 8, 9, 14, 17, 21, 22)

In den Resistenzagar werden entweder Löcher gestanzt, oder kleine Glaszylinder senkrecht eingebracht oder auf den Nährboden Filterpapierblättchen aufgelegt. In die Stanzlöcher, Glaszylinder oder auf die Papierblättchen können Antibiotikumlösungen bekannter Konzentration als sogenannte Kontrollen ein- bzw. aufgebracht werden. Mit einer Bakteriengebrauchsverdünnung wird versucht, auf den Nähragarplatten eine möglichst konstante Inokulation zu erzielen.

In Vergleichslöcher bzw. auf Vergleichsfilterplättchen können Antibiotikumlösungen mit unbekanntem Gehalt gegeben werden. Vom Stanzloch, Glaszylinder bzw. Papierplättchen diffundiert das Antibiotikum in die Peripherie. Empfindlichkeit des Testbakterienstammes vorausgesetzt, kann unter standardisierten Bedingungen aus der Größe

der Hemmhöfe auf den Gehalt an wirksamer antibiotischer Substanz der untersuchten Lösung geschlossen werden. Der Durchmesser des Hemmhofes ist dabei proportional zum Logarithmus der Antibiotikumkonzentration. (22)

2. Reihenverdünnungstest

Der in dieser Arbeit als Mikromethode modifizierte Reihenverdünnungstest soll zunächst im Prinzip erklärt werden:

- a) Eine bekannte Menge Antibiotikum wird mit Bouillon in mehreren Schritten verdünnt, bis in den Bereich der MIC (= minimal inhibitory concentration oder minimale Hemmkonzentration = MHK.). Ein Keim wird in Konzentration von ca. 10^3 Keimen pro ml zugesetzt. - Bebrütung - Ablesung nach 18 - (48h), bei welcher Antibiotikumkonzentration der Keim eben noch am Wachstum gehindert wird.

Durch Überimpfung der gehemmten Proben auf Platten oder einige ausreichend große Bouillonmengen läßt sich nach weiterer Bebrütung auch die MBC = minimale bactericide Konzentration bestimmen.

- b) Eine Probe (z.B. Serum, Urin) unbekannter Konzentration des gleichen Antibiotikums wird ebenfalls mit Bouillon verdünnt. Es wird der gleiche Keim wie bei a) zugesetzt und auch Bebrütung und Ablesung erfolgen

analog a). - Bei einer bestimmten Verdünnung wird auch hier die MIC erreicht.

Nun kann die unbekannte Menge Antibiotikum rechnerisch bestimmt werden. Dies soll an einem Beispiel gezeigt werden.

Ist bei a) die MIC bei $2 \mu\text{g/ml}$ und bei b) bei einer Verdünnungsstufe 1:20 erreicht, so ist die unbekannte Antibiotikumkonzentration $40 \mu\text{g/ml}$.

Es gibt auch Reihenverdünnungstest im Agar, der vorwiegend für Bakteriensensibilitätsprüfungen angewandt wird. (5, 6, 9, 14, 17, 21, 22)

Bei den hier angeführten Testverfahren handelt es sich um biologische Bestimmungsmethoden. Diese weisen zwar im Vergleich zu chemischen oder physikochemischen Testverfahren eine relativ große Fehlerbreite auf, doch ist es mit ihrer Hilfe oft möglich, auch solche Substanzmengen noch zu erfassen, die chemisch nicht zu erfassen sind. Außerdem entsprechen die "biologisch" erhaltenen Testwerte in jedem Fall dem tatsächlich vorhandenen Gehalt an biologisch wirksamen Antibiotikum in der zu prüfenden Substanz. (8) Der in vivo unwirksame Teil des Antibiotikums, der an Protein gebunden ist, wird zwar bestimmt, der metabolisierte Teil jedoch bleibt richtigerweise unberücksichtigt. (5, 11, 12, 18)

Wenn auch die Diffusionsteste mit sehr wenig Blut oder Serum durchführbar sind, wählten wir zur Serumspiegelbestimmung von Ampicillin bei Kindern den Reihenverdünnungstest, für den nach unserer Kenntnis keine Mikromethode beschrieben wurde. Eine solche wurde von uns unter Zuhilfenahme in fast allen Labors verfügbaren Materialien, sowie eines ampicillin-hochempfindlichen, sonst robusten Testkeimes, der eine Vorverdünnung der Serumproben zuließ, entwickelt.

III. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Aus einer größeren Anzahl klinisch gesunder Kinder, wurden 14 als Probanden ausgewählt, bei denen anhand von Rachenabstrichen hämolysierende Streptokokken und ampicillinempfindliche Staphylokokken festgestellt wurden. 7 Kinder erhielten oral eine Dosis von 712 mg Pivampicillin, die einer parenteralen Dosis von 500 mg Ampicillin äquivalent sind, als Einleitung und Therapie. 7 weitere Kinder erhielten 356 mg Pivampicillin, entsprechend 250 mg Ampicillin. (2, 7, 13) Die Blutentnahmen erfolgten durch Stilettierung der Fingerbeere zu folgenden Abnahmezeiten: vorher, sowie 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 min. nach Einnahme. Bei der Gewinnung wurde das Blut entweder direkt in sterile Eppendorfhütchen getropft oder erst mit sterilen Glaskapillaren aufgezogen und dann in die Eppendorfhütchen ausgeblasen.

Das so gewonnene Blut wurde nach Gerinnung zentrifugiert, abgesert und dann zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

2. Auswahl der verwendeten Geräte und Materialien

Da Beschreibungen in der Literatur für den Reihenverdünungstest als Mikromethode fehlen, mußte im einzelnen überlegt und durch Vorversuche untersucht werden, welche Geräte und Materialien sich für die Versuchsdurchführung als brauchbar erwiesen.

2.1. Nährlösung

Um zu vermeiden, daß bei Serumtesten sowohl innerhalb der Versuchsreihe selbst, als auch gegenüber der Vergleichsreihe eine unterschiedliche Nährbodenqualität gerade inbezug auf den Serumgehalt entsteht, ist zunächst eine geeignete Nährlösung nötig. Dazu eignen sich u.a. Leinbrocklösung (9) oder käufliche Fertigpräparate von Merck, Oxoid oder Difco, die international nach Rezepturen von Grove und Randall Verwendung finden. Diese Nährlösungen kann man, dem Anspruchsgrad der Bakterien entsprechend, noch gering modifizieren.

Hier die Zusammensetzung der von uns verwendeten modifizierten Leinbrocklösung: 1 g Pepton (Kaseinhydrolysat Bayer) + 3 g Asparagin + 1 g Glykokoll + 5 g NaCl + aqua dest. ad 1000ccm + 5 g Glucose. Wir gaben noch 10% Pferdeserum hinzu.

Hallmann (9) empfiehlt von einer Testserumverdünnung 1:10 auszugehen. Dabei gehen natürlich die bei Serumverdünnung 1:1 bis 1:9 vielleicht noch erfaßbaren Antibiotikumwerte verloren, allerdings zugunsten einer größeren Exaktheit der gesamten Versuchsanordnung (gleiche Nährbodenzusammensetzung in allen Mulden).

2.2. Herstellung der Keimsuspension

Genauso wichtig, wie eine konstante Nährbodenqualität zwischen Versuchsreihen und Vergleichsreihen ist eine gleichmäßige und konstante Keimeinsaat des Testkeimes; und zwar sind 1000 - 10 000 Keime pro ccm gebräuchlich. (9)

Zur Herstellung der Keimsuspension geht man von frischen Bouillonkulturen aus. Von der frischen Nähragar-Kultur wird von mehreren Einzelkolonien eine halbe Öse Bakterienmasse in Pepton verimpft. Diese Lösung ergibt nach 18-stündiger Bebrütung die sogenannte 18 h - Bouillon. Sie enthält möglichst viele "Koloniebildner", d.h. die Zahl lebender, vermehrungsfähiger Keime kommt näher an die Gesamtkeimzahl heran, als bei Verwendung von Koloniematerial.

Die Keimdichte wurde mit einer Leukozyten - Zählkammer

nach Neubauer kontrolliert.

Wenn bei 400-facher Vergrößerung pro Feld der Kammer bei 0,1 mm Kammertiefe z.B. 6 Keime vorliegen, so enthält die untersuchte Lösung die 160fache Keimzahl je mm^3 , also $6 \times 160/\text{mm}^3 = 10^3/\text{mm}^3$, ungefähr 10^6 Keime/ml. Von da kommt man durch 1000-fache Verdünnung zu der gewünschten Keimdichte: $10^3/\text{ml}$.

Bei Herstellung unserer Keimsuspension stellt sich als Erfahrungswert für die 18 h - Bouillon eine Keimdichte von ungefähr 10^9 Keimen/ml heraus. Durch einen Verdünnungsschritt (1:1000) lag dann in der Regel der für die Zählkammer günstige Bereich vor (5 - 10 Keime pro Gesichtsfeld). Für die Endverdünnung mußte dann nochmal 1000-fach verdünnt werden.

Der erste Verdünnungsschritt erfolgt in physiologische NaCl und der zweite in modifizierte Leinbrock-Lösung.

2.3. Mikroplatten

Zur Auswahl stehen zwei Mikroplatten mit U-förmigen Löchern: massive für wiederholten und leichte für einmaligen Gebrauch. Letztere, als System Cooke bezeichnet und von der Firma Greiner hergestellt, sind bereits steril

verpackt erhältlich. Erfolgreiche Keimfreimachung der massiven Platten erfolgte entweder durch Spülung mit 3%igem H_2O_2 und anschließender Trocknung, oder durch Spülung mit durch Petroläther vergälltem 70% Äthyl-Alkohol. Zur Sicherheit erfolgte danach noch halbstündige Bestrahlung unter UV-Licht.

Die Platten enthalten 12 nebeneinanderliegende U-förmige Muldenreihen von je 8 Mulden mit je 200 μl Fassungsvermögen. Die acht Vertikalreihen sind alphabetisch von A - H durchbezeichnet.

Grundsätzlich sind beide Mikroplatten brauchbar. Für die Versuche wurden die steril verpackten Platten der Fa. Greiner benutzt.

2.4. Titriergeräte

Als nächstes war die Frage nach geeigneten Titriergeräten zu prüfen. - Für die Titrierung der Mikromengen wurden Mikropipetten verschiedener Firmen getestet. Diese als Loops oder Diluters bezeichneten Geräte unterscheiden sich durch die unterschiedliche Kopfform. Gebräuchlich sind solche mit 25 μl und 50 μl Fassungsvermögen. Als physikalisches Grundprinzip dieser Geräte wird die Kapillarkraft ausgenutzt. - Die Anwendung dieser Geräte

erschien sehr verlockend, zumal mit einem Titierrechen die Titration sehr einfach zu handhaben gewesen wäre. Leider erwiesen sich diese Geräte für unsere Versuche aber als ungeeignet. Bei der modifizierten Leinbrock-Lösung und weniger stark verdünntem Serum, war die mit den Loops bzw. Diluters aufgezogene Menge nie konstant 25 bzw. 50 μ l, sondern sehr schwankend, meistens zu wenig, da Luftbläschen in den "Ösen" blieben.

Nach Durchtitrierung mehrerer Reihen mit Farbzusatz auf der Mikroplatte war dies schon rein optisch durch unterschiedlich hohe Flüssigkeitsspiegel zu erkennen. Das Wägen der Loops bzw. Diluters mit einer Präzisionswaage erst ohne und dann mehrmals mit aufgesogener Bouillonflüssigkeit bestätigte die Unbrauchbarkeit dieser Geräte für unser Vorhaben. Die gleichen Versuche mit aqua dest. durchgeführt, ergaben jeweils eine aufgesogene und transportierte Flüssigkeitsmenge von exakt 25 bzw. 50 μ l.

Der Grund für die Unbrauchbarkeit der getesteten Mikropipetten für unsere Nährlösung bzw. Serum war sicherlich die vom aqua dest. oder 0,9 NaCl-Lösung stark unterschiedliche Viskosität der verwendeten Flüssigkeiten.

Auch der Versuch, die Nährlösung durch Zugabe eines Entspannungsmittels in der Viskosität wasserähnlicher zu ma-

chen, brachte nicht den gewünschten Erfolg. Wenn mit Serumverdünnungen ab 1:10 in physiol. Kochsalzlösung oder Aqua destillata gearbeitet werden kann, oder mit Urin, lassen sich die Ösen verwenden. Die Nährlösung wird anschließend mit dem Testkeim in doppelt konzentrierter Form zugetropft. Bei Verwendung der Ösen ergibt sich zusätzlich das Problem, daß die Ösen nach Abflammen benetzt werden müssen, sodann leergelöscht, damit sie feucht sind, aber nicht trocken. Das Löschpapier müßte also steril sein. Da oftmals ab 1:2 bis 1:4 Serumverdünnung gearbeitet wird, mußte deshalb ein anderes Mikrotitriergerät gesucht werden.

Als Alternative boten sich Eppendorfpipetten an. Bei diesen liegt ein anderes physikalisches Prinzip zugrunde. Hier wird ein ausgetriebenes Luftvolumen durch Aufsaugen einer Flüssigkeitsmenge gleicher Größe ersetzt. Bei Einhaltung der vorgeschriebenen Bedienungsanleitung gelangen mit den Eppendorfpipetten exakte Titrationsen der modifizierten Leinbrock-Lösung.

Die Aufsteckspitzen der Eppendorfpipetten aus Plastik werden nicht steril geliefert. Sie konnten, ohne sich zu verformen, im Autoklaven bei 121°C und 1 atü bei 15 min. Dauer sterilisiert werden. Auch Spitzen des englischen "Oxford-Samplers" sind geeignet.

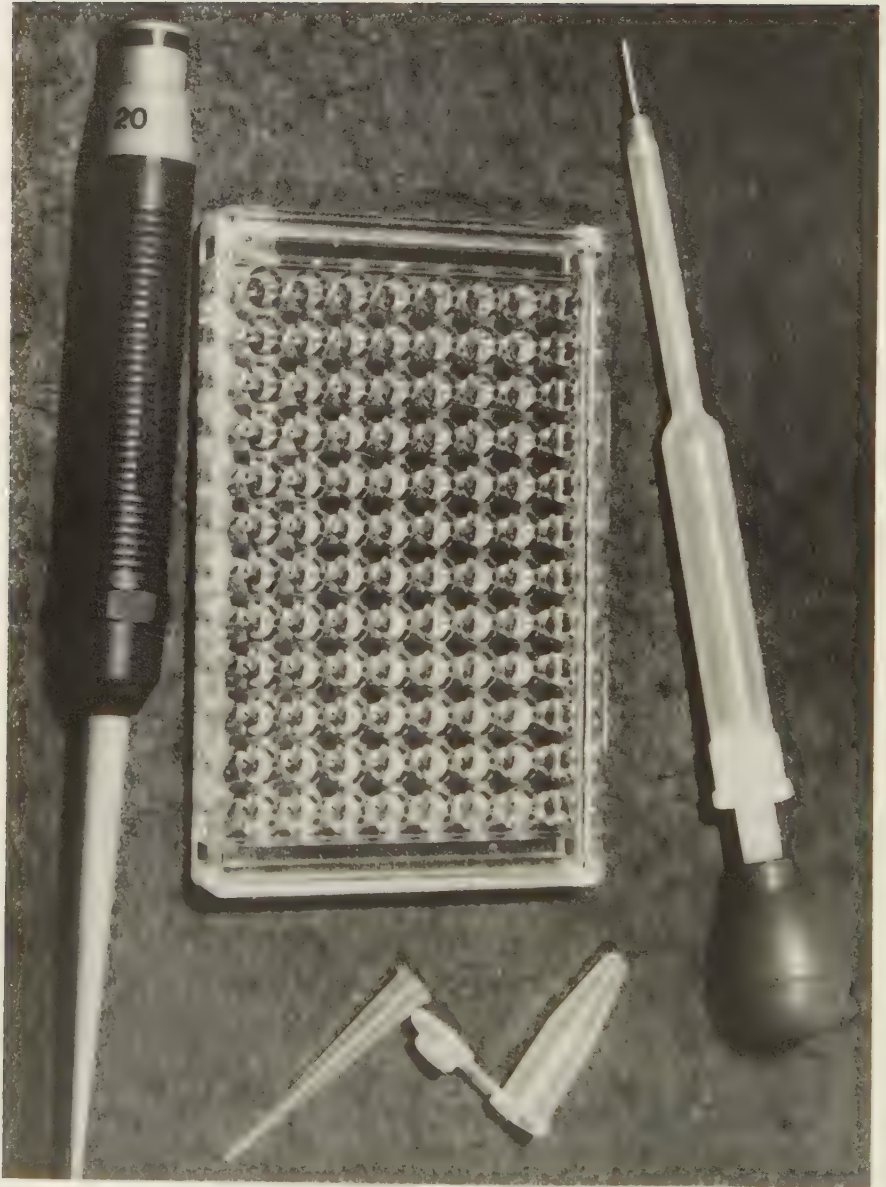


Abb.1 Verwendetes Gerät: Eppendorfpipette, dazugehörige Aufsteckspitze, Mikrotitrierplatte System Cooke, Tropfer, Eppendorfhütchen.

2.5. Vorlegen von Nährlösungen oder anderer Flüssigkeiten

Zum Vortropfen der Bouillon in den Mulden der Mikroplatten wurden genormte Tropfer für 25 μ l Tropfen getestet.

- In einem 1 ml Meßzylinder wurden genau 40 Tropfen modifizierter Leinbrock-Lösung gegeben. Es ergab sich stets eine größere Menge als 1 ml. Bei der Verwendung von aqua dest. ergab sich jeweils genau 1 ml. Der Grund für die zu große Tropfengröße bei Leinbrock-Lösungen war wahrscheinlich wieder die zu große Viskosität oder Adhäsion. Konsequenz aus diesen Untersuchungen war die Selbstherstellung eines Tropfers. Verschiedene Nadelgrößen der Einmalspritzen wurden abgesägt und durch Aufbiegen solange manipuliert, bis ein Tropfer vorhanden war, der bei modifizierter Leinbrock-Lösung eine genaue Tropfengröße von 25 μ l erbrachte.

2.6. Auswahl des Testkeimes

Zur Durchführung des Reihenverdünnungstestes mußten Keime gefunden werden, die bestimmte Bedingungen erfüllen.

- a) Die Keime sollen nicht oder wenig pathogen sein.
- b) Die Keime sollten in der zur Verfügung stehenden Nährlösung (modifizierte Leinbrock-Lösung) wuchsfreudig

sein: in 12 - 18 h eindeutiges Sediment.

- c) Sie sollen eine möglichst geringe MIC haben, damit sehr geringe Blutmengen zur Untersuchung nötig sind, bzw. noch minimale Antibiotikummengen nachgewiesen werden können.

Zusätzlich zu diesen Punkten ist ein ausreichender Zuckergehalt der Nährlösung zu beachten. Er muß sich nach dem Spaltungsvermögen der Testkeime richten, damit, selbst bei unsichtbarem Wachstum, eine pH-Indikatorreaktion möglich wird.

Wir wählten als Testkeim einen laboreigenen *Staphylococcus aureus*, der ebenso sensibel wie SG 511 ist, aber ein kräftigeres, körniges Sediment und gute Glucosespaltung zeigte.

Zur Ermittlung der ungefähren MIC des Testkeimes wurden 106,00 mg Ampicillin-Natrium eines handelsüblichen Präparates abgewogen (Binotal, Deripen, Amblosin) und in zwei Schritten auf 1,0 µg/ml Ampicillin verdünnt. Davon ausgehend wurden mit modifizierter Leinbrock-Lösung Verdünnungen geringerer Konzentration hergestellt.

Die durch Grobtestung ermittelte MIC des verwendeten Testkeimes lag in der Größenordnung von 0,01 µg/ml. Die Grobtestung erfolgte in Verdünnungsstufen 1:3.

Wichtig ist das Wissen um die Größenordnung der MIC, weil das Verdünnungsschema des Antibiotikums speziell so ausgerichtet werden konnte, daß danach die MIC genauer erfaßt wurde. Die genaue Beschreibung der Herstellung der Verdünnungsreihen bzw. der Titrierung wird im weiteren Verlauf beschrieben.

Generell gibt es als Indikatoren nicht nur die hier angewendete Säurebildung durch geeignete zuckervergärende Keime. Es können weiter der Trübungsgrad der bewachsenen Kulturen und zum anderen der Hämolysegrad als Indikator benutzt werden. Letzteres setzt dann blutkörperchenhaltige Nährlösungen und hämolysierende Testkeime voraus. (9)

Eine turbidimetrische Methode im Röhrchen (bzw. Kuvetten) bietet den Vorteil nur weniger Stunden Bebrütung und stufenloser Ablesung in angemessenem Bereich; denn unterhalb des MIC-Wertes wird das Bakterienwachstum noch verzögert. Bei Indikatorzusatz schon vor der Bebrütung in der Nährlösung ist eine Beeinflussung des Bakterienwachstums möglich.

3. Herstellung der Ampicillinverdünnungen

Wegen der notwendigen Reproduzierbarkeit der MIC des Testkeimes die erreicht werden mußte, war es nötig, die Verdünnung des Ampicillinpräparates jeweils möglichst genau durchzuführen.

Wie o.a. wurde von 106,00 mg Ampicillin-Na eines handelsüblichen Präparates ausgegangen. Diese Pulvermenge gelöst in 1 l sterilem aqua dest. war die Ausgangslösung, die somit eine Konzentration von 0,1 mg Ampicillin pro ml hatte. Die Verdünnung erfolgte in einem geeichten 11-Meßkolben.

Im ersten Verdünnungsschritt wird 1:100 verdünnt, 1 ml der Ausgangslösung wurden mit 99 ml modifizierter Leinbrock-Lösung verdünnt. Dies erfolgt im geeichten 100 ml-Meßkolben. Die so hergestellte Vorverdünnung 1 hat eine Konzentration von 1 µg/ml.

Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgen mit der modifizierten Leinbrock-Lösung, um der später hinzutropfen- den Bakteriensuspension möglichst konstante Wachstumsbedingungen zu bieten.

Ausgehend von der Vorverdünnung 1 erfolgt in einem 2. Verdünnungsschritt die Herstellung der Verdünnungen, mit

denen dann die Startreihe der Kontrollplatte beschickt wird. Dies sind die Verdünnungen 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 0,04 $\mu\text{g/ml}$ und 0,025 $\mu\text{g/ml}$. Diese Verdünnungen werden nicht abhängig voneinander, sondern getrennt aus Lösung 1 hergestellt, um durch möglichst wenig Verdünnungsschritte den Verdünnungsfehler so gering wie möglich zu halten.

Sämtliche Verdünnungen wurden, je nach Größe der zu transportierenden Menge, entweder mit Enzympipetten oder Eppendorfpipetten durchgeführt.

Bei jeder Verdünnung muß für gute Durchmischung gesorgt werden!

Herstellung der Verdünnung für die Startreihe der Kontrollplatte:

(1)	0,1	$\mu\text{g/ml}$:	0,5	ml	+	4,5	ml
(2)	0,06	$\mu\text{g/ml}$:	0,3	ml	+	4,7	ml
(3)	0,04	$\mu\text{g/ml}$:	0,2	ml	+	4,8	ml
(4)	0,025	$\mu\text{g/ml}$:	0,125	ml	+	4,875	ml

4. Kontrollplattenherstellung für die Reihenverdünnung

Auf der Kontrollplatte werden in die Startreihe A jeweils 100 μl der Startverdünnungen (1), (2), (3) und (4) ge-

ben.

Um den Aussagewert der zu ermittelnden MIC zu erhöhen, wird eine Doppelbestimmung durchgeführt, indem die Mulden 5 - 8 genauso beschickt werden wie die Mulden 1 - 4.

In den Mulden der horizontalen Reihen B - F werden 50 μ l modifizierter Leinbrock-Lösung vorgelegt. Dann erfolgt die Durchtitrierung der acht Vertikalreihen mit der 50 μ l Eppendorfpipette. Aus A werden 50 μ l aufgenommen und nach B transportiert; durch viermaliges Aufziehen ist gute Durchmischung gewährleistet. Dann werden 50 μ l aus B in C gegeben, - wieder Durchmischung durch viermaliges Aufziehen - und analog wird dann weitertitriert. Die letzten 50 μ l aus F werden verworfen.

Nach beendeter Titration gibt man mit dem Tropfer 50 μ l Bakteriensuspension (Inokulum) in jede der titrierten Mulden, also zwei Tropfen.

Durch die Titration wurde die Konzentration der Startreihe nicht verändert in die ja 100 μ l vorgelegt waren.

Mit der Zugabe der Bakteriensuspension wurde jeweils nochmal 1 : 1 verdünnt.

Folgende Tabelle zeigt den Endverdünnungsstand der Kon-

trollplatte, der bei Ablesung gültig ist:

	(1)	(2)	(3)	(4)	
A	0,05	0,03	0,02	0,0125	$\mu\text{g/ml}$
B	0,025	0,015	0,01	0,00625	$\mu\text{g/ml}$
C	0,0125	0,0075	0,005	0,003125	$\mu\text{g/ml}$
D	0,00625	0,00375	0,0025	0,0015625	$\mu\text{g/ml}$ x 2
E	0,003125	0,001875	0,00125	0,00078125	$\mu\text{g/ml}$
F	0,0015625	0,0009375	0,000625	0,00039062	$\mu\text{g/ml}$
G					
H					

Die Reihen G und H werden als Kontrollreihen benutzt.

In die Reihe G wird in jeder Mulde 50 μl unbeimpfte Leinbrocklösung belassen, um diese nach Bebrütung auf Reinheit zu überprüfen. In Reihe H wird die vorgelegte Leinbrock-Lösung mit 50 μl Bakteriensuspension beimpft. Dies geschieht zur Überprüfung der Bakteriengebrauchsverdünnung; die Keime müssen hier nach Bebrütung in jeder Mulde gewachsen sein.

Die fertig titrierte Platte wird mit abgeflammter Alufolie steril abgedeckt, so daß nachträglich keine Verunreinigung durch Fremdkeime mehr eintreten kann.

Die abgedeckte Mikroplatte wird in eine feuchte Kammer

gegeben, damit nicht durch ungleichmäßige Verdunstung eine Verfälschung der Ergebnisse eintritt. Es erfolgt dann 18-stündige Bebrütung im Brutschrank bei 37°C.

Die Platten werden abgelesen:

- a) bei Dunkelfeldbeleuchtung, wobei das charakteristische, kräftige körnige Sediment des Testkeimes auch schon als Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung durch Fremdkeime gelten kann;
- b) endgültig nach Hinzutropfen von 1 Tropfen Säureindikator.

Wir verwendeten Bromthymolblau in einer Konzentration von 0,01%, die aus einer Gebrauchslösung von 0,1% hergestellt wird. Der pH-Bereich ist 6,0 - 7,6. Im sauren Bereich ist die Farbe gelb und im alkalischen blau und bei pH 7 grün. (9)

5. Reproduzierbarkeit

In mehrwöchiger Testung wurden jeweils von Tag zu Tag Kontrollplatten hergestellt, um folgende Fragen zu klären:

- a) Ist die Herstellung jeweils frisch angesetzter Ampicillinverdünnungen aus handelsüblichen Präparaten nach der beschriebenen Technik und dem angegebenen

Verdünnungsschema exakt reproduzierbar?

- b) Läßt die Wirksamkeit des verdünnten Ampicillins bei Lagerung im Kühlschrank über mehrere Tage nach?
- c) Beeinträchtigt ein- oder zweimaliges Auftauen der Ampicillinverdünnungen die Wirkung des Ampicillins?

Die Ampicillinverdünnungen wurden mit aqua dejonisata bzw. aqua dest. pH 5 hergestellt. Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, daß jeweils frisch angesetzte Ampicillinverdünnungen nach dem o.a. Schema titriert stets zur gleichen MIC geführt haben.

Die Wirksamkeit des Ampicillins wird bei mehrtägiger kühler Lagerung, (bis 8 Tage wurde untersucht) und durch ein- oder zweimaliges Auftauen und Einfrieren während diesen Zeitraums nicht beeinträchtigt.

Die vorangegangenen Untersuchungen waren wichtig, weil die für die Testung vorgesehenen ampicillinhaltigen Blutseren nach Gewinnung eingefroren worden waren, um dann en bloc verarbeitet zu werden.

Bei eventuell zu erwartenden Fehlbestimmungen (falscher Titrationsbereich bei Fehleinschätzung der Höhe des Ampicillinspiegels), mußte eine Zweitbestimmung möglich sein.

6. Wuchsbild der Kontrollplatte

Folgendes Bild zeigt das Durchschnittsergebnis von Kontrollplatten, die über mehrere Wochen lang tägl. hergestellt wurden, wobei sich das Ergebnis als gut reproduzierbar erwies.

A	()	()	()	()	
B	()	()	()	()	
C	()	()	(+)	(+)	
D	()	(+)	(+)	(+)	x 2
E	(+)	(+)	(+)	(+)	die mit + be-
F	(+)	(+)	(+)	(+)	zeichneten Mul-
					den sind be-
					wachsen

Verglichen mit dem Verdünnungsschema auf Seite 25 ergeben sich folgende Verdünnungswerte, bei denen der Testkeim

- a) gerade noch wächst
- b) gerade nicht mehr wächst:

a) Wachstum	0,00312	0,00375	0,005	0,00312
b) kein Wachstum	0,00625	0,0075	0,01	0,00625

Ampicillinkonzentration in µg/ml

7. MIC-Ermittlung

Die MIC ist definiert als die Antibiotikumkonzentration, bei welcher der Testkeim gerade nicht mehr wächst.

Diese Konzentration mit dem Reihenverdünnungstest genau zu ermitteln ist nicht möglich. Es wird dort die Verdünnungsstufe als MIC angenommen, bei welcher der Keim gerade nicht mehr wächst.

In dem Verdünnungsschema der Kontrollplatte (S. 25) sind deshalb untereinander abgestufte Verdünnungsreihen gewählt, wodurch eine bedingte Interpolation der MIC möglich ist. Nach den Ergebnissen der Kontrollplatte wurde die Verdünnungsstufe von 0,00625 µg/ml als MIC - Wert angenommen, womit ein reproduzierbarer Fehler in Kauf genommen wird, der aber beim Reihenverdünnungstest nicht zu vermeiden ist.

8. Voruntersuchungen zur Pivampicillinresorption

Nachdem durch den bisherigen Verlauf der Voruntersuchungen die gute Reproduzierbarkeit der Kontrollplatte feststand, nahmen 3 erwachsene Probanden nach dem Frühstück eine einmalige Dosis Pivampicillinhydrochlorid von 712 mg in Kapselform ein. Die Blutabnahme erfolgte vor, und

nach 60, 120, 240, 360 min. Anhand dieser gewonnenen Blutproben sollte die Anwendungsmöglichkeit der Testmethode geprüft werden, bevor die Bestimmung des Ampicillin-gehaltes der gewonnenen Kinderseren erfolgen konnte.

Aus den zu erwartenden Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf die Spiegel bei Kindern gezogen werden, da über die Resorptionsmengen aus dem kindlichen Verdauungstrakt keine ausreichenden Werte bekannt waren; gar keine lagen vor nach Einnahme von Pivampicillin als freie Base in Saftform, die neu entwickelt wurde.

8.1. Probenentnahme

Die Blutabnahme erfolgte jeweils aus der Fingerbeere mit sterilem Haemostilet. Vor dem Einstich wurde die Fingerbeere mit einem alkoholgetränkten Wattetupfer desinfiziert. Die Abnahmetechnik bis einschließlich zur Aufbewahrung durch Einfrieren erfolgte analog wie unter III-1 angegeben.

Angestrebt war jeweils eine Blutmenge von 300 μ l, die durch eine Markierungsstelle an den Eppendorfhütchen gekennzeichnet worden war.

Einmaliges Stilettieren und Auspressen erbrachte schon meistens die gewünschte Menge.

Durch die nur bedingt sterilen Abnahmemaßnahmen stellte sich die Frage, ob dadurch eine Einsaat von versuchsfremden Keimen vermieden werden konnte.

Der weitere Verlauf der Untersuchungen zeigte, daß beide Abnahmemethoden ausreichend waren. Wahrscheinlich ist dabei die natürliche Blutbakterizide von bedeutender Wichtigkeit.

Bei der Verwendung von Urin als Testflüssigkeit ist bei Verwendung von Sartorius- oder Schleicher und Schüllmembranfilter mit einer Porendichte von $0,2 \mu$ die erforderliche Keimfreifiltration möglich.

Zusätzlich zu der Fingerbeerentnahme erfolgte einmal eine Abnahme von 2 ml aus der Armvene. Dieses Blut wurde in mehreren Portionen eingefroren. Mit diesen Proben sollte zum einen untersucht werden, ob die Ampicillinspiegel bei Abnahme aus Fingerbeere und Armvene zum gleichen Abnahmezeitpunkt gleich hoch sind, zum anderen sollte geprüft werden, ob die Wirksamkeit des Ampicillins im Serum durch zweimaliges Auftauen innerhalb von 8 Tagen nachläßt.

Für die Reihenverdünnung müssen die Seren so weit vorverdünnt werden, daß die Vorverdünnungen der anzulegenden Verdünnungsreihen in den Testplatten im Größenordnungs-

bereich der MIC liegen. Dadurch sollen unnötig lange Titrationsen vermieden werden, die zu ungenaueren Ergebnissen führen. Diese Größenordnungswerte nach Einnahme von Pivampicillin-Kapseln wurden der Literatur entnommen. (2, 7) Abgestimmt auf diese Orientierungswerte konnte dann ein Verdünnungsschema hergestellt werden, das die MIC mit großer Wahrscheinlichkeit enthielt.

8.2. Anwendung der Methode bei Erwachsenen

In der Literatur über Pivampicillin wurden bei Erwachsenen folgende Ampicillin-Durchschnittsspiegel nach Applikation von Pivampicillinhydrochlorid angegeben, wobei 358 mg Pivampicillinhydrochlorid in Gelantinekapseln oral gegeben einer parenteralen Dosis von 250 mg Ampicillin entsprechen. (2, 7)

Bei Gabe von 358 mg Pivampicillinhydrochlorid entsprechen 250 mg Ampicillin:

Abnahme-								
zeiten:	30	60	90	120	180	240	360	(min)
Spiegel:	4,18	5,16	4,93	3,27	1,62	0,75	0,25	(μ g/ml)

Bei Gabe von 716 mg Pivampicillinhydrochlorid entsprechend 500 mg Ampicillin:

Abnahme- zeiten:	30	60	90	120	180	240	360	(min)
Spiegel:	6,39	9,54	9,06	7,25	3,08	1,44	0,42	($\mu\text{g/ml}$)

Diese Werte sind Resultate von Diffusionsmethoden und dienen als Richtwerte für den zu wählenden Verdünnungsbereich bei Verwendung des Teststaphylococcus aureus im Reihenverdünnungstest.

Der durchschnittlich höchste Spiegel wird bei Gabe von 358 mg Pivampicillin nach 60 min mit 5,16 μg Ampicillin pro ml erreicht. Bei 716 mg Pivampicillin ebenfalls nach 60 min mit 9,54 $\mu\text{g/ml}$. Der durchschnittlich niedrigste Spiegel bei 358 mg Pivampicillin wird nach 360 min mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Bei 716 mg Pivampicillin auch nach 360 min mit 0,42 μg Ampicillin pro ml.

Die Durchschnittsspiegel bewegen sich also insgesamt im Bereich zwischen 0,25 μg und 9,54 μg Ampicillin pro ml.

Die MIC-Größe von 0,00625 $\mu\text{g/ml}$ zugrunde gelegt, ergibt sich für den niedrigsten Spiegel als Quotient aus 0,25 : 0,00625 ein ungefähr 400-facher Verdünnungsfaktor. Beim höchsten Spiegel ergibt sich als Quotient aus 9,54 : 0,00625 ein ungefähr 1450-facher Verdünnungsfaktor.

Um sowohl für 358 mg und 716 mg Pivampicillinhydrochlorid alle damit erreichten Ampicillinspiegel zwischen 30 und

360 min zu erfassen, wären also mindestens Verdünnungsbereiche zwischen 400- und 1450-facher Verdünnung nötig. Bei Kindern mit 40 kg Körpergewicht sind nach Einnahme von 716 mg Pivampicillin höhere Werte als bei Erwachsenen zu erwarten.

Für die Erstellung von Verdünnungsschemata sind aber noch weitere Gesichtspunkte zu beachten:

- Um größere Verdünnungsfehler zu vermeiden, muß der Verdünnungsbereich der MIC mit möglichst wenig Verdünnungsschritten erreicht werden.
- Es gibt geringere Verdünnungsfehler, wenn die Ausgangsverdünnungen der Startreihe nicht untereinander abhängig, d.h. eine aus der anderen, sondern getrennt aus der gleichen Vorverdünnung hergestellt werden.
- Es können nicht beliebig große Mengen titriert werden. Zum einen sollen möglichst 50 μ l Serum ausreichen, denn die ursprünglich gewonnene Menge Serum war bei jeder Abnahme mindestens 100 μ l. Zum anderen ist die Einfüllmenge durch die Muldengröße der Platten bei 200 μ l begrenzt. Schließlich können nur solche Mengen titriert werden, für die Eppendorfpipetten in entsprechender Größe vorhanden sind. Sonderanfertigungen sind aber erhältlich.

Uns standen 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500 und 1000 μ l-Eppendorfpipetten zur Verfügung.

Unter Berücksichtigung der angeführten Gesichtspunkte sind mehrere Verdünnungsschemata möglich.

Bei der Ermittlung des Ampicillingehaltes der Blutseren der drei erwachsenen Probanden wurden mehrere verschiedene Verdünnungsschemata angewendet.

Folgende Spiegel wurden ermittelt:

Abnahmezeit:	60	120	240	360	(min)
Proband B.J.	15,25	8,8	2,5	1,6	($\mu\text{g/ml}$)
Proband W.R.	10,4	8,2	4,8	1,2	($\mu\text{g/ml}$)
Proband M.B.	16,8	6,5	1,4	0,42	($\mu\text{g/ml}$)

Die ermittelten Werte zeigen eine gute Korrelation zu den Ergebnissen anderer Autoren. (2, 7)

Durch die Spiegelmessungen konnten die auf S. 31 angeführten Fragen geklärt werden. Bei gleichzeitiger Blutentnahme aus der Fingerbeere und aus der Armvene waren die in diesen Proben ermittelten Spiegel gleich hoch. Die Wirksamkeit des im Serum enthaltenen Ampicillins läßt durch zweimaliges Auftauen innerhalb von 8 Tagen nicht nach.

Da sich der Reihenverdünnungstest als Mikromethode durch die vorausgegangenen Vorversuche als gut durchführbar

erwies, wurden Verdünnungsschemata für die Ermittlung von Ampicillinspiegeln bei Kindern hergestellt.

9. Verdünnungsschemata für die Kinderseren

Aufgrund des relativ größeren Blutvolumens und extracellulären Raumes sind bei Kindern bei Applikation gleicher Dosen je kg Körpergewicht wie bei Erwachsenen niedrigere Spiegel zu erwarten.

Als Therapie ist normal, 12,5 mg Ampicillin pro kg Körpergewicht pro Einzeldosis zu verabreichen. Diese Einzeldosis wird 4 x eingenommen und die Menge ist dann ungefähr 50 mg/kg/Tag. Es sind verschieden hohe Serumspiegel zu erwarten, wobei ein einziges Schema nicht ausreicht, die bei den verschiedenen Abnahmezeiten unterschiedlich hohen Spiegel zu erfassen.

Folgende erprobten Schemata 1 - 3 umfassen den gesamten Bereich, um sowohl die höchsten als auch die niedrigsten Ampicillinkonzentrationen der Seren bei Gabe von 712 mg Pivampicillin zu ermitteln.

Das Schema 1 ist für die höchsten Spiegel, d.h. für die Abnahmen nach 30, 60 und 90 min.

Verdünnungsschema 1

20 μ l Testserum zusammen mit 180 μ l modifizierter Leinbrock-Lösung als Vorverdünnung ergibt Lösung I entsprechend 1:10. Aus Lösung I werden die Ausgangsverdünnungen der Startreihe der Testplatte hergestellt:

20/100	25/175	20/180	20/180	Serum/Leinbrock-
(1:60)	(1:80)	(1:100)	(1:100)	Lösung)
				(Verdünnung)

In Reihe 1 - 3 werden jeweils 50 μ l modifizierter Leinbrocklösung vorgelegt und es werden, ausgehend von der Startreihe, jeweils 50 μ l titriert, also jeweils Verdünnung 1:2.

In Reihe 4 werden 100 μ l vorgelegt und jeweils 50 μ l titriert. Dort liegt dann jeweils Verdünnung 1:3 vor.

In Reihe 4 wird durch die größeren Verdünnungsstufen die Zahl der Verdünnungsschritte im Vergleich zu Reihe 1 - 3 verringert und damit wahrscheinlich auch der Verdünnungsfehler. - Dies ist bei der Interpolation mit den Ergebnissen der Reihen 1 - 3 wichtig.

Die Startverdünnungen der Reihen 1 - 3, nämlich 1:60, 1:80 und 1:100 sind untereinander abgestuft und gestatten nach Ablesung der Testplatte bessere Interpolation als z.B. 2 Startverdünnungen 1:100 und 1:150, die sonst

bei serologischen Arbeiten ausreichend sind.

Die Technik des Titrierens erfolgt genauso wie bei Herstellung der Kontrollplatten mit Eppendorfpipetten.

Nach beendeter Titration wird die Bakteriensuspension hinzupipettiert oder hinzugetropft. Dadurch erfolgt noch einmal Verdünnung 1:2, womit dann der endgültige Verdünnungsstand hergestellt ist.

Die weitere Behandlung der Testplatten, wie Abdeckung, feuchte Kammer, Ablesung etc. erfolgt ebenso wie bei der Kontrollplatte.

Bei Schema 1 sieht der für die Ablesung endgültige Verdünnungsstand der Testplatte wie folgt aus:

	1	2	3	4
A	1: 120	1: 160	1: 200	1: 200
B	1: 240	1: 320	1: 400	1: 600
C	1: 480	1: 640	1: 800	1: 1800
D	1: 960	1: 1280	1: 1600	1: 5400
E	1: 1920	1: 2560	1: 3200	1: 16200
F	1: 3840	1: 5120	1: 6400	1: 48600
G	1: 7680	1: 10240	1: 12800	1: 145800

Die Titrationsmengen bei Schema 2 und 3 sind die gleichen wie bei Schema 1, lediglich die Vorverdünnungen

sind zum Teil anders. Bei Schema 3 ist zusätzlich in Reihe vier die Vorlage geändert; statt 100 μ l wird nur 50 μ l vorgelegt. Da die Titrationsmenge die gleiche bleibt, wird dann dort bei jedem Titrationsschritt 1:2 verdünnt.

Verdünnungsschema 2

Verdünnungsschema 2 gilt für die Abnahmen nach 120 und 180 min. Daraus werden folgende Vorverdünnungen für die Startreihe hergestellt:

50/150	25/125	20/180	20/180	(Serum/Leinbrock- Lösung
(1:20)	(1:30)	(1:50)	(1:50)	(Verdünnung)

Endverdünnungsstand für Schema 2, gültig bei Ablesung

	1	2	3	4
A	1: 40	1:60	1: 100	1: 100
B	1: 80	1:120	1: 200	1: 300
C	1: 160	1:240	1: 400	1: 900
D	1: 320	1:480	1: 800	1: 2700
E	1: 640	1:960	1: 1600	1: 8100
F	1: 1280	1:1920	1: 3200	1: 24300
G	1: 2560	1:3840	1: 6400	1: 72900

Verdünnungsschema 3

Dieses Schema gilt für die Abnahmen nach 240 und 360 min.

Dabei werden zwei Vorverdünnungen 1:3 und 1:10 hergestellt. Reihe 1 beginnt mit Verdünnung 1:3, Reihe 2 mit 1:6, Reihe 3 mit 1:10 und Reihe 4 mit 1:20.

Endverdünnungsstand für Schema 3, gültig bei Ablesung

	1	2	3	4
A	1: 6	1: 12	1: 20	1: 40
B	1: 12	1: 24	1: 40	1: 80
C	1: 24	1: 48	1: 80	1: 160
D	1: 48	1: 96	1: 160	1: 320
E	1: 96	1: 192	1: 320	1: 640
F	1: 192	1: 384	1: 640	1: 1280
G	1: 384	1: 768	1: 1280	1: 2560

10. Ergebnisse bei Kindern

Die Serumproben nach Einnahme von Pivampicillin, deren Gewinnung unter III.1 beschrieben wurden, wurden mit der beschriebenen Methode auf den Gehalt an Ampicillin untersucht.

Die Ablesung erfolgt wie bei der Kontrollplatte beschrieben; die nicht bewachsene Mulde mit der geringsten Verdünnung wird zur Ausrechnung herangezogen.

Bei den hier angewandten Verdünnungsschemata, wo für eine Bestimmung jeweils vier titrierte Reihen mit abgestuften Verdünnungsunterschieden vorliegen, kann dieser Wert graduell abgeschätzt werden. Dadurch besteht eine statistische Absicherung technisch bedingter Titrierfehler. Der abgelesene Verdünnungsfaktor multipliziert mit der Vergleichs-MIC der Kontrollplatte ergibt die Antibiotikumkonzentration im Probandenserum.

Ergebnisse siehe Tabelle I und Schaubild I, das Schaubild der Durchschnittsspiegel aller 7 Probanden nach Einnahme von 712 mg Pivampicillin.

Auffallend sind die z.T. extrem hohen Serumspiegelwerte bei dem Probanden B.J. Durch Doppelbestimmung wurden diese Werte aber bestätigt.

10.1. Ergebnisse bei anderen Probandengruppen

Bei einer weiteren Gruppe von Kindern mit Körpergewicht von 25 bis 35 kg und einer Einzeldosis von 356 mg Pivampicillin entsprechend 250 mg Ampicillin als Kapsel, wurde die Titration analog durchgeführt, nur die Seren etwas geringer vorverdünnt.

Ergebnisse siehe Tabelle II und Schaubild II, als Bild der Durchschnittswerte dieser Probandengruppe.

Für 2 ähnliche Gruppen von Kindern, die eine neue Dar-

reichungsform des Pivampicillins als freie Base in Sirup nahmen, wurde genauso titriert, jedoch wegen der halb so starken Resorption bei gleicher Dosis je kg KG mit noch geringerer Vorverdünnung der Seren.

Die Ergebnisse waren jeweils gut reproduzierbar und stimmten in Titerverlauf und Titerhöhe mit Werten überein, die mit Hilfe eines Agar-Plattendiffusionstestes erzielt wurden. (2, 7)

Tabelle I

Ergebnistabelle:

Abnahmezeiten	30	60	90	120	180	240	360 (min)
Proband	Gewicht	Ampicillinspiegel in µg/ml					
B.R.	45 kg	8	8	10	10	6,25	2,5
K.F.	43,1 "	0,2	9,4	9,4	10	5	2
K.D.	43 "	6,25	10	10	10	10	5
St.M.	45,3 "	10	16	10	8,75	5	2
L.B.	53,8 "	1,25	10	16	16	8	3
B.J.	45,2 "	2,5	24	31,9	12	6	3
V.St.	47,2 "	4	12	12	12	8	2,5
Durchschnitts- spiegel		4,63	12,8	14,4	11,1	6,8	2,75
							0,62

712 mg Pivampicillin = 500 mg Ampicillin = 10-12,5 mg/kg KG pro Einzeldosis

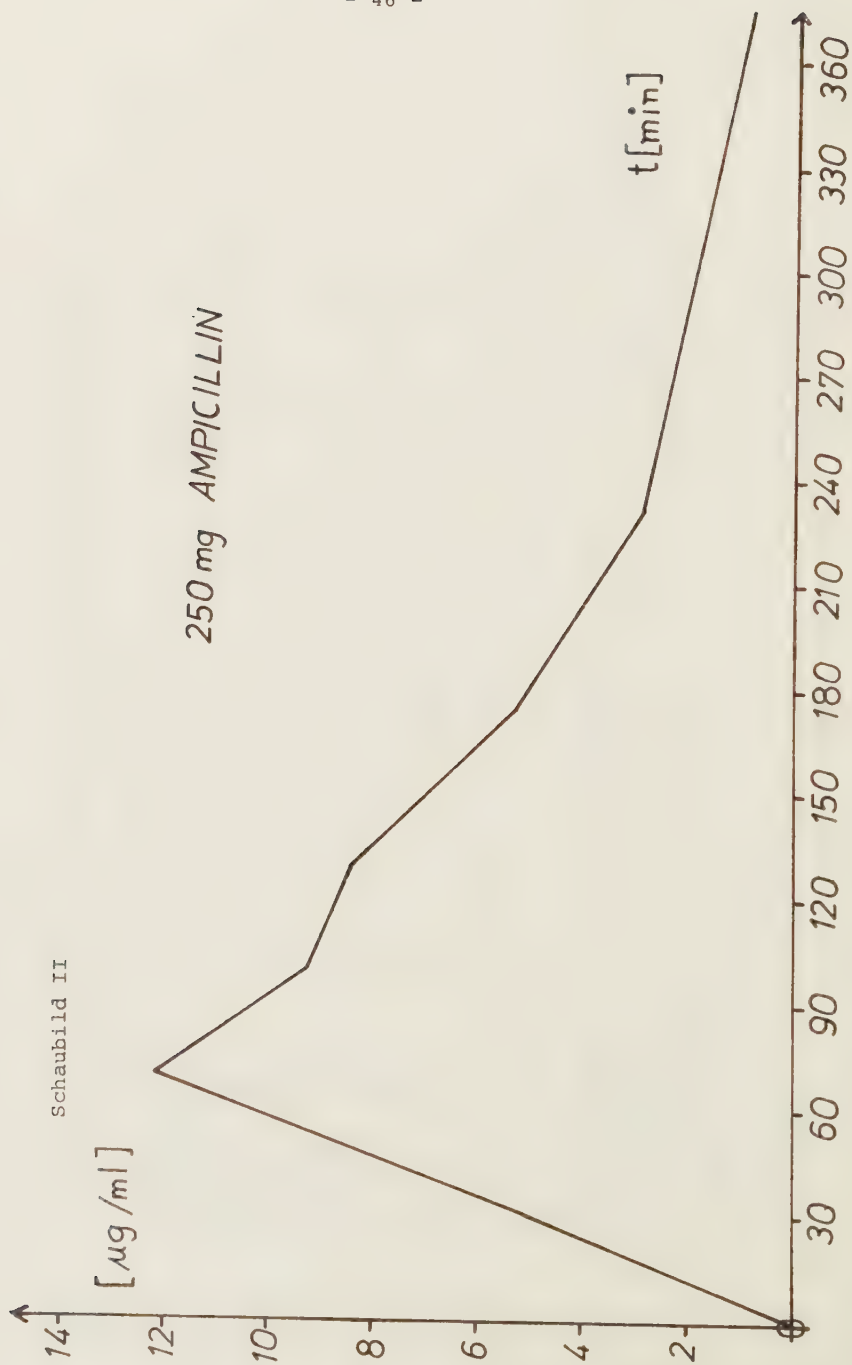


Tabelle II

Ergebnistabelle:

Abnahmezeiten:	30	60	90	120	180	240	360 (min)
Proband	Ampicillinspiegel in $\mu\text{g/ml}$						
L.K.	34,1 kg						
H.A.	35,0 "	5	16	6,25	10	2,5	0,375
M.H.	35 "	0	0,75	1,25	4	0,5	0
L.K.	28 "	1	16	10	4	4	1
R.J.	25,5 "	8	24	24	5	1,2	0
S.M.	33,4 "	1,5	5	6	20	2,4	0,15
R.W.	25,4 "	10	12	8	8	8	1
					3	2	0,15
Durchschnitts- spiegel:	5,1	12,2	9,3	8,45	5,35	2,94	0,53

356 mg Pivampicillin $\approx$ 250 Ampicillin = 7-10 mg/kg KG pro Einzeldosis



IV. Diskussion

1. Zur Schwankungsbreite der einzelnen Serumspiegel

Bei der Betrachtung der Einzelwerte fallen einzelne, besondere Spiegel auf. Einige Kinder haben bereits sehr früh (30') hohe Werte, obwohl bei keinem Probanden vor Einnahme eine antibakterielle Aktivität im Serum nachweisbar war.

Auffallend hohe oder niedrige Werte wurden durch wiederholte Doppelbestimmung abgesichert. Besonders der Proband B.J. wies 2 - 3 mal höhere Spiegel auf als die anderen Probanden.

Nimmt man diesen Probanden aus der Rechnung der maximalen Durchschnittsspiegel heraus, so stimmt der Mittelwert von 11,2 $\mu\text{g/ml}$ besser mit den Werten der Literatur überein, die meist mit Plattendiffusionstesten erzielt wurden. (2, 7)

Daß diese Schwankungsbreite nicht labortechnisch, sondern biologisch bedingt ist, sieht man an den Probanden aus der Gruppe, die 356 mg Pivampicillin erhielt: Einer begann erst viel später mit der Resorption, ein anderer erreichte 24 $\mu\text{g/ml}$. Auch deutlich geringere Resorptionen mit gleichmäßigem An- und Abstieg der Kurve sind möglich.

2. Vor- und Nachteile von Diffusionsmethoden und von Reihenverdünnungstesten

Das Pro und Contra ist abhängig von der Zielsetzung, die bei Anwendung dieser Methoden jeweils angestrebt wird: Sensibilitätsprüfung von verschiedenen Bakterien oder Aktivitätsbestimmung von Proben wie Serum, Urin, Sekrete oder Gewebe.

Bei der Messung von Antibiotikumsiegeln kann für die Diffusionsteste der geringe Zeit- und Materialverbrauch und die Anwendungsmöglichkeit beim Vorliegen leichter Verunreinigungen als Vorteil angeführt werden; die Probe braucht hierbei also nicht steril zu sein.

Die Schichtdicke und Qualität des Agars, die Keimeinsaatdichte, die Vordiffusionszeit, die Flüssigkeitsmenge und Qualität der Standards sowie der Proben spielen eine Rolle.

Für lange Versuchsreihen können diese Bedingungen nicht konstant gehalten werden und bedeuten so bei quantitativen Aussagen nicht kontrollierbare Fehlerquellen. Hallmann (9) stellt aus diesen Gründen die Anwendung der Diffusionsteste für exakte quantitative Aussagen in Frage.

Als konstant für eine Versuchsserie kann dagegen die Diffusionsgeschwindigkeit des Antibiotikums angesehen

werden. Die Diffusionsgeschwindigkeit eines Antibiotikums in gallertigen Substanzen ist zwar abhängig von der Menge und Gelierfähigkeit des Agar-Agar, dem Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens und von der Molekulargröße des Antibiotikums selbst, aber im Rahmen derselben Versuchsreihe sind diese Variablen konstant. Schwieriger ist es in der Routine, jede Platte genau nach der heute üblichen Vordiffusionszeit von 30 min. zu bebrüten.

Grundbedingungen für gute Resultate bei den Diffusionstesten sind gleichmäßige Dicke des Agar-Mediums und gleichmäßige Bakterieneinsaat. Je kleiner die Einsaat, umso empfindlicher ist die Methode, aber das Inokulum muß groß genug sein, um kleine dicht gelagerte Kolonien zu bilden, die einen scharf begrenzten Hemmhof geben.

(22) Um gleiche Einsaatdichte zu erzielen, werden zuvor Trübungsmessungen im Vergleich zu einem Bariumsulfat-standart empfohlen. Selbst bei frischem Bouillonmaterial ist diese Bedingung am schwierigsten konstant zu halten, da Keimzahlen nicht gleich Koloniebildnerzahlen sind. Falls beim Plättchendiffusionstest die Antibiotikumtestmengen sehr groß sind im Verhältnis zur MIC des Testkeimes, nimmt der Hemmhof nur so gering zu, daß z.B. 20 und 30 $\mu\text{g/ml}$ nur 1 mm Durchmesserunterschied zeigen. Geringere Mengen wie z.B. 1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigen, aufgrund der logarithmischen Zunahme, deutlichere Unterschiede.

Daraus ist zu folgern, daß bei Serumspiegelbestimmungen genauso wie beim Reihenverdünnungstest Serumverdünnungen erfolgen müssen, um in einem günstigen Bereich klare Unterschiede zu erkennen. Zudem werden sich 3 - 4 fach Bestimmungen nicht vermeiden lassen, um einen statistischen Mittelwert der Hemmhöfe zu erhalten. Hierfür werden die Formeln nach Deutschberger und Kirschbaum verwandt, die es gestatten, eine gerade Bezugslinie der Standards aufzustellen. (3)

Oberer Wert der Standardgeraden $\bar{y}_1$:

$$\frac{3y_1 + 3y_2 + y_3 - y_5}{5}$$

unterer Wert der Standardgeraden $\bar{y}_5$:

$$\frac{3y_5 + 2y_4 + y_3 - y_1}{5}$$

Bei 20 μ l Serum je Plättchen ist bei 4 Proben ca. 0,1 ml Serum nötig, eine solche Menge reicht aber auch für eine Mikroreihenverdünnung gut aus.

Plattendiffusionsteste sind nicht so empfindlich wie der Reihenverdünnungstest, mit letzterem gelingt es, geringere Substanzmengen nachzuweisen. (9)

Die Plattendiffusionsteste, und dabei hauptsächlich der Plättchentest, sind als die Methode der Wahl bei Sensibi-

litätsprüfungen pathogener Keime zur Erstellung von Antibiotogrammen anzusehen. (1, 8, 9, 17, 22)

Die Hemmhofgröße kann je nach Möglichkeit, konstante Bedingungen einzuhalten, im Vergleich von Spezies untereinander semiquantitativ bis quantitativ als Maßstab für die MIC genommen werden.

In einem semilogarithmischen Koordinatensystem, welches die MIC auf der Ordinate und die Hemmhofdurchmesser auf der Abszisse aufweist, werden die Werte eines sehr empfindlichen und eines weniger empfindlichen Keimes der gleichen Spezies, z.B. *Escheria coli*, eingetragen, und mit einer Regressionsgeraden verbunden. Die MIC anderer *Escheria coli* lassen sich nach Bestimmung ihrer Hemmhöfe unter gleichen Bedingungen ablesen.

Diese Methode verlangt sehr viele Zwischenkontrollen zur Prüfung der eingehaltenen konstanten Bedingungen. Von Vorteil ist dagegen die stufenlos ablesbare MIC auf der Regressionsgeraden.

Bei quantitativen Messungen ist der Reihenverdünnungstest von größerer Genauigkeit. Er gestattet auch kleineren Laboratorien ohne ausreichenden Mengen von hoch- und mäßigempfindlichen Kontrollstämmen jeder Spezies, die für die Plättchendiffusionsteste als Vergleich nötig sind, die MIC in Antibiotika-Testbouillon zu bestimmen.

Beim Reihenverdünnungstest ist zudem die kombinierbare Ermittlung von MIC und MBC möglich.

Bei Diffusionstesten sind Sekrete und visköse Flüssigkeiten problematisch, da die gleiche Flüssigkeit für die Standardwerte schwerlich in gleicher Menge und Art zu beschaffen ist.

Schließlich ist der Plattenverdünnungstest zu erwähnen, bei dem auf Agar-Platten mit verschieden starkem Antibiotikumgehalt das Wachstum von zu testenden Keimen geprüft wird. Er ist nur im Massenbetrieb ab 100 bis 200 Keimisolaten je Tag rentabel bei relativ hohem Konsum an Material: z.B. bei Ampicillin je Platte für 0,5, 2, 8 und 32 µg/ml Agar und ca. 25 Bakterienproben je Platte von 9 cm Durchmesser.

Bei 10 ähnlich abgestuften Antibiotikas sind 100 Platten für 25 Keime nötig.

Beim quantitativen Plättchendiffusionstest inklusive 10 Testkeimen mit bekannter MIC sind 35 normale Agar-Platten für Resistenzbestimmungen mit je 10 Antibiotikumtestplättchen mit einer festgelegten Konzentration notwendig. Im Falle der Reihenverdünnung bei 10 Antibiotikas mit 4 Konzentrationen und bei 25 Keimproben 12 1/2 Mikroplatten und etwa 150 ml Antibiotika-Bouillon.

Die Ergebnisse all dieser Methoden erlauben nur bedingte Rückschlüsse auf die MIC in vivo, z.B. im Blut, die noch von anderen Faktoren abhängt.

Es erschien erstrebenswert, den Nachteil des großen Material- und Zeitaufwandes bei Anwendung des Reihenverdünnungstestes in Bouillon durch seine Modifizierung als Mikromethode einzuschränken. Auch bei vergleichenden Antibiotikumspiegelmessungen, bei denen nur geringe Proben der zu untersuchenden Flüssigkeiten vorhanden sind, erscheint diese Anwendungsform interessant.

3. Anmerkungen zu dem verwendeten Gerät und Material

Beschreibungen des Reihenverdünnungstestes in der Anwendung als Mikromethode liegen in der Literatur nicht vor. Deshalb mußte überlegt und getestet werden, welche Materialien zur Versuchsdurchführung in Frage kommen.

- Mit den beschriebenen Mikrotitrierplatten System Cooke und den Eppendorfpipetten o.ä. wurde für die Viskosität der unverdünnten Testseren und für Bouillon geeignetes Titriergerät gefunden. Bei vorverdünnten Seren käme Titration in aqua dest. mit "Diluter" und Mikroösen in Frage und Zugabe doppelt konzentrierter Bouillon mit dem Testkeim.

Es bewährt sich, die Keimsuspension aus 18 h-Bouillon in der Größenordnung von 10^3 Keimen pro ccm, wie es Hallmann (9) empfiehlt, zuzusetzen. Resistente Varianten sind hierbei statistisch kaum zu erwarten. In den nur mit Nährlösung ohne Antibiotikuzusatz gefüllten Reihen der Kontrollplatten und Testplatten kam es nach Beimpfung mit der Keimsuspension nie zu Ausfällen beim Bakterienwachstum.

- Mit entscheidend für diese gute Wuchsfreudigkeit der Testbakterien und damit gute Ablesbarkeit der Mikroplatten ist sicherlich auch die hier als Nährlösung gebrauchte modifizierte Leinbrock-Lösung mit Pferdeserum. Genausogut ist aber auch, abhängig vom Anspruchsgrad des verwendeten Testkeimes, die Anwendung anderer standardisierter Nährlösungen für Antibiotikum-Bestimmungen möglich, die alle auf einem verminderten Peptongehalt basieren.
- Die Auswahl des Testkeimes kann den jeweiligen Erfordernissen entsprechend getroffen werden. Sind z.B. hohe Spiegel zu erwarten (Urin), so ist ein relativ unempfindlicher Testkeim mit hoher MIC zu empfehlen, weil dadurch die Anzahl oder Größe der Verdünnungsschritte verringert wird und dadurch der Gesamtverdünnungsfehler. Beispielsweise kann als Testkeim *Escheria coli* benutzt werden. Bei Indikatornachweis kann dann Laktose als zu

vergärender Bestandteil der Nährlösung zugesetzt werden. Verunreinigende Luftkeime, die Lactose spalten, sind nicht zu befürchten und daher ggfs. erkennbar.

Hohe Spiegel sind zum Beispiel bei über die Niere ausgeschiedenen Antibiotika im Urin vorhanden. Die Spiegel sind dabei zum Teil mehr als 100fach höher als im Blut, was ja auch therapeutisch bei Harnwegsinfekten genutzt wird. So ist es auch beim Breitbandpenicillin Ampicillin. (5, 16)

Sollen wie bei den beschriebenen Untersuchungen erwünscht, noch geringe Spiegel ermittelt werden, so ist ein Testkeim mit geringerer MIC zu verwenden.

4. Die Ampicillinverdünnungen

Die Ampicillinverdünnungen wurden, ausgehend von 106,00 mg eines handelsüblichen Präparates, das Ampicillin-Na enthielt, hergestellt. Die Verdünnungen müssen sehr exakt durchgeführt werden. Mit Hilfe von Enzympipetten und Eppendorfpipetten gelang eine reproduzierbare Herstellung der Verdünnungen.

Einschließlich der Verdünnungsschritte die bei der Titration auf der Kontrollplatte erfolgen, sollte die MIC innerhalb der ersten 5 Verdünnungsschritte erreicht werden,

weil sonst die Verdünnungsfehler zu groß werden. Dies war in der Regel möglich. Es ist weiter darauf zu achten, daß die Verdünnungen einen genügend hohen Anteil an Nährlösung enthalten, um den Testbakterien möglichst konstant gleiche Wachstumsbedingungen wie auf den Testplatten zu bieten. Bei weniger empfindlichen Testkeimen und bei Verdünnungen von 1:2 - 1:4 der Probe ist das nicht möglich.

5. Kontrollplattenherstellung

Die reproduzierbare Herstellung der Kontrollplatte ist Voraussetzung für die Brauchbarkeit der entwickelten Methode. Ohne etwas über die Haltbarkeit der Ampicillinverdünnungen zu wissen, muß damit gerechnet werden, daß die Wirksamkeit des Ampicillins bei mehrtägiger Lagerung nachläßt. Deshalb wurde für die Herstellung der Vorverdünnungen jeden Tag ein frisches Präparat verwendet.

Bei mehrwöchiger Testung erwies sich durch das konstante Wuchsbild der Kontrollplatte eine konstante reproduzierbare Herstellung der MIC.

Durch parallele Testungen wurde außerdem festgestellt, daß beim Ampicillin die Wirksamkeit bei Lagerung der leicht sauren Lösung über acht Tage im Kühlschrank und

bei -20°C nach ein- oder zweimaligem Auftauen während dieser Zeit nicht beeinträchtigt wird. Das eröffnet die Möglichkeit, eine Ampicillinverdünnung in mehreren Portionen einzufrieren, um sie dann bei Bedarf innerhalb von acht Tagen zum Gebrauch aufzutauen.

Die Frage eines eventuellen Wirkungsverlustes beim Ampicillin wurde unter den gleichen Bedingungen auch bei den Testseren untersucht und das Ergebnis wurde bestätigt. Bei den Serumspiegelermittlungen konnte dadurch eine in wenigen Fällen erforderliche Wiederholung erfolgen.

Die Frage des Wirkungsverlustes ist bei Verwendung anderer Antibiotika als zu testende Substanzen in jedem Fall einzeln zu prüfen, falls keine Literaturangaben vorliegen.

Das Einfrieren der Vorverdünnungen in mehreren Portionen, die dann jeweils bei Bedarf aufgetaut werden können, bedeutet nämlich labortechnisch eine ziemliche Arbeitserleichterung.

6. Prüfung der eigenen Ergebnisse

Die in den Tabellen auf S. 43 und 45 angeführten Ergebnisse ergeben in ein Schaubild übertragen die Wirkspiegel - Zeitkurven für Ampicillin nach Gabe von Pivampicillin. (Schaubild I und II)

Es wurde festgestellt, daß Pivampicillin schnell resorbiert wird. Nach einem schnellen Anstieg der Serumkonzentrationen - die höchsten Spiegel wurden im Durchschnitt zwischen 60 und 120 min. festgestellt - erfolgt ein baldiger Abfall der Serumspiegel. Nach 4 Stunden lag noch ein durchschnittlicher Serumspiegel von 2 - 3 $\mu\text{g/ml}$ vor. Nach diesem Zeitpunkt (4 - 6 h) sollte eine weitere Medikation erfolgen, wenn Dauerspiegel erwünscht sind. Nach 6 Stunden lagen die mittleren Spiegel unter 1 $\mu\text{g/ml}$, woraus folgert, daß bei gewünschter intermittierender Therapie die nächste Dosis voraussichtlich nach 8 Stunden erfolgen sollte.

Obwohl eine gute Korrelation zu Ergebnissen anderer Autoren (2, 7) besteht, ist ein Vergleich damit problematisch; zumindest sind die Vergleiche absolut ermittelter Zahlenwerte nicht möglich. Ein Grund dafür ist das Problem der Standardisierung bei den biologischen Testmethoden, wobei schon die Verwendung komplexer lebender Organismen als Indikatoren eine Rolle spielt. (22)

Ericcson und Sherris (5) berichten von einem internationalen Arbeitskreis, der sich mit Standardisierungsfragen von Reihenverdünnungstesten und Diffusionstesten beschäftigt:

Sowohl für die Plattendiffusionsteste als auch für die

Reihenverdünnungsteste gibt es keine gültigen regionalen, nationalen oder internationalen Standardisierungen, die Material und Methodik genau vorschreiben. An ihnen wird seit Jahren gearbeitet und sie sollen in Deutschland erst für quantitative Tests vorgeschrieben werden. - Durch eine Unzahl von Abweichungsmöglichkeiten bei der Anwendung dieser Methoden können Bestimmungen, die in verschiedenen Labors durchgeführt werden, nicht objektiv miteinander verglichen werden.

Selbst bei Testungen in zuverlässigen Labors nach bis ins Detail beschriebenen Versuchsleitungen, wurden verschiedene Resultate erzielt.

Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf kleine Abweichungen in der Durchführung der Technik, auf Reagenzverschlechterung oder auf Ableseunterschiede zurückzuführen.

(5)

Das Problem der Standardisierung stellt schon einen Vergleich der Ergebnisse bei Anwendung der gleichen Testmethode in Frage. Noch mehr fraglich ist es, ob man Ergebnisse von Diffusionstesten und Reihenverdünnungstesten miteinander vergleichen kann, was von Schönfeld (17) bezweifelt wird. Er führt dazu als Argument einen Hauptunterschied an. Beim Reihenverdünnungstest wirkt das An-

tibiotikum auf das Inokulum bevor es zu wachsen anfangen kann (MIC). Bei den Diffusionstesten diffundiert das Antibiotikum in den Nährboden während die Bakterienkulturen wachsen, je nach Dauer der Diffusionszeit vor Beginn der Bebrütung, die jetzt meist mit 30' vorgeschlagen wird. Bei hohen Konzentrationen ist nach 30' u.U. ein anderer Zustand als bei niedrigeren um das Plättchen gegeben: Serum diffundiert und fördert bei niedriger Konzentration des Antibiotikums das Anwachsen. Auch kann aus der Kante des Plättchens bei niedrigem Gehalt die Diffusion unproportional schlechter erfolgen als bei mittlerem Gehalt - unscharfe Höfe sind die Folge. Sehr hoher Gehalt an Antibiotikum schließlich ist auch nicht mehr verwertbar.

Für die durchgeführten Testungen der Serumspiegel kann das Problem der Standardisierung als gelöst betrachtet werden, denn es konnte eine Konstanz der Versuchsbedingungen erzielt werden (Nährlösungen die international käuflich sind, Keimsuspension und Vorverdünnungen).

Da die Verdünnungsschemata so eingerichtet waren, daß in der Regel nicht mehr als 5 Verdünnungsschritte zur Erreichung der MIC nötig waren, blieb der Verdünnungsfehler in Grenzen. Durch gegeneinander abgestufte Verdünnungsreihen war zur Vermeidung technisch bedingter Titrierfeh-

ler zusätzlich eine statistische Absicherung geben.

Aufgrund der guten erzielten Reproduzierbarkeit bei Anwendung der beschriebenen Methode, ist diese als Bestimmungsmethode bei Antibiotikumspiegelmessungen zu empfehlen, besonders wenn die Fehlerquellen der Diffusionste-ste unüberwindbar sind. Es stellt sich die Frage, ob nicht für mittlere und kleinere Laboratorien in all den Fällen, wo eine Bestimmung der MIC und der MBC eines Sepsiserregers nötig ist oder die Kontrolle der Serumspiegel bei toxischen Antibiotika oder Ausscheidungsstörungen, die Anwendung der beschriebenen Mikroreihenverdünnung als einzige Methode einfacher und sicherer ist.

Für die Sensibilitätsprüfung von Bakterien in der Routine sollte wie bisher die Beurteilung R= resistent, Me= mäßig empfindlich und E= empfindlich ausreichend sein, da das nachweislich therapeutische Überschreiten der MIC des jeweiligen Keimes noch keinen Erfolg garantieren kann.

V. Zusammenfassung

Der Reihenverdünnungstest (abgestufter Röhrchentest) ist als Makromethode, d.h. Testreihen in Reagenzgläsern, eine anerkannte Testmethode, die in bakteriologischen Labors zur Ermittlung von Antibiotikumsiegeln, sowie der MIC und MBC von pathogenen Keimen in schweren Fällen (Sepsis, Endocarditis) angewendet wird. (5, 6, 9, 14, 17, 21, 22)

In der vorliegenden Arbeit wird die Ausarbeitung und Anwendung des Reihenverdünnungstestes als Mikromethode zur Ermittlung von Ampicillinsiegeln im Serum von Kindern nach Gabe von Pivampicillin beschrieben.

Als Material dienen überall erhältliche Mikrotitrierplatten System Cooke, als Titriergeräte Eppendorfpipetten o.ä., als Nährlösung modifizierte Leinbrock-Lösung und als Testkeim ein laboreigener *Staphylococcus aureus*.

Die über mehrere Wochen lang jeden Tag hergestellten Kontrollplatten beweisen eine gute Reproduzierbarkeit und bestätigen die Brauchbarkeit der Methode. Die Gefahr von Verunreinigungen ließ sich leicht beherrschen.

Diese Anwendungsform ist eine materialsparende Variante und zur Kontrolle der in vivo erzielten Antibiotikum-

spiegel zu empfehlen.

Die Verdünnungsschemata müssen je nach Versuchskeimen und dem verwendeten Antibiotikum jeweils speziell erstellt werden, um unnötig lange Titrationsreihen- und Fehler zu vermeiden.

Die Vor- und Nachteile gegenüber anderen Testverfahren - Plattendiffusionstest und Plattenverdünnungstest wurden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turek,
M.: 1966 Am.J.Clin. Path. 45:493
2. Daehne, W. von, Godtfredsen, W.O., Roholt, K. und
Tybring, L.: Pivampicillin, ein
neuer oral wirksamer Ampicillin-
tester
Übersetzt aus: Antimicrobial Agen-
to and Chemotherapie, 1970,
Hobby, G.L. (Hrsg.) Am. Soc. Micro-
biol. Bethesda, 1971, 431-437
3. Deutschberger, J. und Kirschbaum, A.: Aus Antibiotics
und Chemotherapy, Val. IX, No. 12
1959, S. 752 - 754
4. Eckhardt, R.: Die Nebenwirkungen der wichtigsten
antibiotisch wirksamen Substanzen,
Therapiewoche 23, 16, 1407 (1973),
Seite 9
5. Ericcson, H.M. und Sherris, J.C.: Antibiotic Sensiti-
vity Testing, Report of an Intern.
Collaborative Study Acta Path.
et Microb. Scand. Sect. B. 1971,
Suppleur Nr. 217
6. Ericsson, Hans: Rational use of antibiotics in
hospitals, (Studies on laboratory
methods and discussion of the
biological basis for their clinical
application)
Universitäts-Bibliothek München
Diss. ext. 2 8512 S. 4 - 7
7. Frederiksen, E., Godtfredsen, W.O., Nielsen, B. und
Roholt, K.: Pivampicillinhydrochlo-
rid - ein neues Breitband-Antibio-
tikum zur oralen Applikation;
Übersetzung aus Nordisk Medicin 86,
1971, 1376
8. Greub, H.R.: Vergleichende Untersuchungen zwi-
schen Resistenzprüfung in vitro
und Therapieeffekt
Schweiz, med. Wschr. 96, Nr. 36,
1161 - 1168 (1966)

9. Hallmann, L.: Bakteriologische und serologische Technik, Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag (1961), S. 774 - 793
10. Jawetz, E., Melnick, J.L. und Adelberg, E.A.: Medizinische Mikrobiologie Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York (1968)
11. Kunin, C.M.: 1967, Clinical significance of protein binding of the penicillins Ann. N. Y. Acad. Sci. 145: 282 - 290
12. Naumann, P.: Erwünschte und unerwünschte Wirkungen moderner Antibiotika in Therapiewoche 21, 18, 1445, (1971)
13. Nilsson, L.B.: Langzeitbehandlung mit Pivampicillinhydrochlorid Eine klinisch toxikologische Studie Übersetzung aus: Nord.Med. 86, 1971, (1381-1383)
14. Reploh, H. und Otte, H.J.: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1965)
15. Rohwedder, H.J. und Nagorny, J.: Untersuchungen über Blut- und Harnspiegel bei Behandlung mit versch. Antibiotika im Kindesalter
16. Schmidt-Mende, M. et al.: Behandlung von Harnwegsinfekten mit Pivampicillin Münch. med. Wochenschr. 39 (1972) 1659 - 1663
17. Schönfeld, J.K.: The investigation of bacterial sensitivity in regard to antibiotics Universitäts-Bibliothek München Diss. ext. 2 7967 1-3
18. Simon, C. und Stille, W.: Antibiotika - Therapie in Klinik und Praxis F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York (1973)

19. Steuer, Christa (Peter Naumann): Wie wertvoll ist
ein Antibiotikum, Südd. Zeitung,
Nr. 158 v. 18.7.1974, S. 9
20. Walter, A.M. und Heilmeyer, L.: Antibiotika-Fibel
Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
21. Wiesmann, E.: Medizinische Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
22. Zähler, H. und Maas, W.K.: Biology of antibiotics
Springer-Verlag, New York, Heidelberg,
Berlin 1972, S. 25 - 27

Lebenslauf

Am 3. Juli 1945 wurde ich als Sohn des Bauingenieurs Heinrich Behrends und seiner Frau Gretchen, geb. Brauer, in Wittmund geboren.

Ich besuchte die Volksschule und das Gymnasium in Jever. 1966 bestand ich dort das Abitur.

Es folgten zwei Jahre Wehrdienst.

Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Sommersemester 1969.

Im Juli 1974 legte ich das Staatsexamen an der Universität München ab.

